ПАРАЗИТОЛОГИЯ, XIX, 4, 1985

УДК 576.895.121 : 591.34 : 576.8.097.34

РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ КОРАЦИДИЕВ ПСЕВДОФИЛЛИДНЫХ ЦЕСТОД И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЦЕСТОДОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

В. И. Фрезе, М. В. Далин, Е. Г. Сергеева

Установлена способность корацидиев цестод к агглютинации в гомологичной антисыворотке. Описан метод проведения реакции прямой агглютинации корацидиев (РПАК) в культурах живых личинок. При сравнении результатов РПАК в гомологичных и гетерологичных вариантах установлена зависимость картин агглютинации от степени гомологичности антисыворотки. На примере РПАК цестод *D. dendriticum* и *D. ditremum* в поливалентной и видоспецифической антисыворотках к *D. dendriticum* показана возможность использования РПАК в работах по видовой систематике псевдофиллидных цестод.

Явление склеивания мелких частиц в результате формирования специфичного иммунологического комплекса известно уже с конца прошлого века. Это явление (реакция агглютинации) широко используется в медицине (как метод диагностики заболеваний), в микробиологии (титрование содержания бактерий и вирусов) и в иммунологии (при количественной оценке антиаллотопических сывороток и т. д.). Способность к специфичной агглютинации более крупных элементов, в частности многоклеточных организмов, до настоящего времени не была известна. При изучении иммуносистематики цестод рода *Diphyllobothrium* нами (Frese e. a., 1983) впервые была подмечена способность корацидиев цестод специфично агглютинировать в антисыворотках к соответствующим видам паразитов (реакция прямой агглютинации корацидиев — РПАК), и были предприняты попытки использования РПАК для решения отдельных вопросов систематики указанной группы цестод.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

РПАК проводили с корацидиями, полученными из культуры яиц от половозрелых стробил *D. dendriticum* (Nitzsch, 1824) и *D. ditremum* (Creplin, 1825). Тщательно отмытые яйца помещали в кристаллизаторы с дистиллированной водой объемом до 100 мл таким образом, чтобы яйца свободно лежали на дне сосуда. Кристаллизаторы содержали на свету при комнатной температуре. Воду ежедневно меняли, а яйца при этом взбалтывали струей воды из пипетки, чтобы они не приклеивались ко дну и равномерно освещались и обогащались кислородом. При этих условиях корацидии выходили во внешнюю среду через 5—7 дней, преимущественно в утренние часы. Их отлавливали тонкой пипеткой в часовое стекло, откуда удаляли избыток воды и таким образом получали суспензию корацидиев достаточной концентрации.

При постановке РПАК мы ориентировались на наблюдения Фишера с соавторами (1934), согласно которым при постановке реакции агглютинации в первую очередь следует обратить внимание на концентрацию трех основных ингредиентов реакции: сыворотки, поверхностных антигенов и солей. При этом мы принимали, что для каждого компонента реакции агглютинации должна быть экспериментально найдена зона варьирования концентраций, в которой изменения интенсивности агглютинации должны быть специфически характерными для данной реакции.

© Издательство «Наука», «Паразитология», 1985 г.

В ходе экспериментов было установлено, что в случаях, когда концентрация NaCl в экспериментальных растворах отличается в большую или меньшую сторону от диапазона 0.82—0.87 %, наблюдается картина полного склеивания корацидиев. Внутри указанных границ агглютинация не наблюдается. Тем самым был определен диапазон концентраций NaCl, пригодный для определения агглютинационных свойств корацидиев (0.85 % NaCl).

Далее экспериментальным путем была определена концентрация антисыворотки (Ас), которая обеспечивает констатацию специфичного действия данного фактора и исключает агглютинацию корацидиев за счет неспецифичного агглютинирующего эффекта. При этом специфичность действия Ас определялась путем постановки РПАК с гетерологичной системой ПАг (поверхностные антигены корацидиев). В результате было определено оптимальное разведение Ас=1/16, т. е. условия, когда реакция с неспецифичными ПАг полностью отсутствует.

И, наконец, в эксперименте было установлено оптимальное количество корацидиев для постановки РПАК. Оно оказалось эквивалентно 40—60 экз. при условии использования молодых, активно плавающих в толще воды корацидиев.

Для определения свойств РПАК корацидиев отсаживали в плашки с круглодонными лунками, куда добавляли Ас, разведенную физиологическим раствором с концентрацией NaCl 0.85 % (pH=7.2) в отношении 1/16.

Результаты РПАК видов *D. dendriticum* и *D. ditremum*
в антисыворотке к *D. dendriticum*

Вид корацидиев	НКС	Исходная сыворотка	Адсорбированная сыворотка
D. dendriticum	—	+++	++++
D. ditremum	—	++	±

В качестве контроля использовали нормальную кроличью сыворотку (НКС), полученную от кроликов до иммунизации и разведенную тем же физиологическим раствором в 16 раз. Реакции были поставлены в гомологичных и гетерологичных вариантах с поливалентной и адсорбированной Ас (см. таблицу). Полное склеивание всех корацидиев (++++), большая часть корацидиев склеена, но нет единого конгломерата («пуговки») (+++), склеенные корацидии образуют разрозненные конгломераты, но есть и отдельные, несклеенные корацидии (++), среди большинства несклеенных корацидиев имеются отдельные конгломераты из 3—4 особей (+), имеется 2—3 конгломерата из 3 корацидиев (±), нет ни одного конгломерата из более чем 2 корацидиев — отрицательный результат (—).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты представлены в таблице и на рисунке (*1—4*).

В первой (контрольной) серии опытов корацидиев обоих указанных видов помещали в НКС. Как видно из таблицы и на рисунке *1*, агглютинация в этом случае полностью отсутствовала. Корацидии сохраняли способность к вращательному и поступательному движению и были относительно равномерно распределены в объеме лунки, в том числе и в приповерхностных слоях.

Во второй серии опытов корацидии вида *D. dendriticum* были помещены в исходную (поливалентную) гомологичную антисыворотку. В этом случае наблюдалась картина агглютинации с образованием относительно крупных конгломератов (см. таблицу и рисунок, *2*) в придонных слоях лунки. Образования единого конгломерата («пуговки») в этой серии не наблюдалось, не обнаружены и отдельные корацидии (подвижные или неподвижные).

В следующей (третьей) серии, где в поливалентную антисыворотку к *D. dendriticum* были помещены корацидии вида *D. ditremum*, также регистрировали агглютинацию (образование конгломератов корацидиев), однако в отличие от предшествующей серии, во всех лунках имелось значительное количество отдельных (неагглютинировавших) корацидиев, а число корацидиев в каждом конгломерате было, как правило, меньше. Отдельно расположенные корацидии не обладали двигательной активностью и располагались в придонных слоях.

В четвертой серии опытов корацидиев *D. dendriticum* помещали в гомологичную монозональную (видоспецифическую) антисыворотку, полученную после адсорбции исходной поливалентной антисыворотки на гетерологичном антигене (*D. ditremum*). Картина агглютинации в этом варианте представлена типичной «пуговкой», т. е. все корацидии в каждой лунке склеиваются в единый конгломерат.

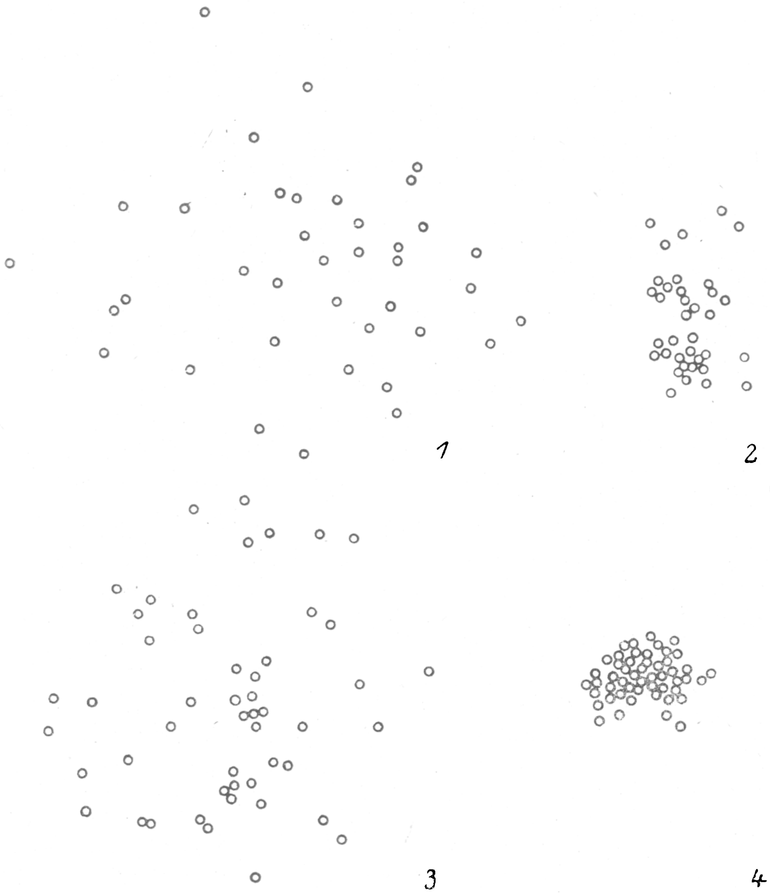
При помещении в эту же антисыворотку (видоспецифическую к *D. dendriticum*) корацидиев вида *D. ditremum* агглютинацию практически не наблюдали (пятая серия опытов, см. таблицу). Отмечено небольшое число конгломератов, включающих не более 2—4 особей, остальные корацидии были рассредоточены в придонном слое лунки. В ряде случаев отмечали слабое вращательное движение корацидиев, поступательную двигательную активность не регистрировали.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как известно, корацидии псевдофиллидных цестод имеют округлую форму и достигают в диаметре до 0.320 мм (диаметр корацидиев у исследованных видов лентецов 0.090—0.120 мм). Наличие мощного ресничного аппарата, покрывающего всю поверхность тела, обеспечивает их двигательную активность, которая выражена в двух основных формах.

Во-первых, это вращательно-колебательные движения, которые расцениваются как адаптация, направленная на заражение промежуточных хозяев—ракообразных, за счет имитации поведения их основных пищевых объектов (жгутиконосцы, коловратки, инфузории и т. п.). Кроме того, корацидии, обладающие положительным фототаксисом, направленно движутся к источнику освещения (к поверхности воды), причем скорость этого движения колеблется от 450 до 900 мм в час (Hilliard, 1960). Крупные размеры (масса) корацидиев и скорость (энергия) их двигательной активности определенно указывает на то, что агглютинация этих организмов не может обусловливаться теми физическими механизмами, которые играют роль в случае агглютинации мелких (бактерии, эритроциты и т. п.) объектов (энергия поверхностного натяжения, сила электрических зарядов) (Зильбер, 1958; Lefkovits, Pernis, 1984, и др.). Очевидно также, что любая агломерация корацидиев возможна только в том случае, когда по тем или иным причинам ими будет утрачена способность к движению.

Визуальные наблюдения показывают, что потеря (или снижение) двигательной активности в действительности является первой фазой РПАК, и в определенной степени позволяют установить механизмы, действующие на этой фазе. Так, в первые же секунды после помещения корацидиев в видоспецифическую гомологичную антисыворотку (четвертая серия опытов) визуально наблюдается картина полной адгезии (прилипания) ресничного аппарата корацидиев. Для этой серии опытов характерна синхронность адгезии — все используемые в каждом опыте корацидии практически одновременно прекращают движение (включая вращательно-колебательную форму активности) и начинают опускаться на дно лунки. Механизм адгезии в данном случае имеет единственную трактовку. Видоспецифические антитела, образуя комплексы с антигенами, располагающимися на поверхности ресничек, характерным образом изменяют коллоидные, поверхностные свойства образовавшегося комплекса. Его частицы приобретают свойство взаимного склеивания (Гостев, 1959). В результате при соприкосновении соседних ресничек происходит их склеивание, что и приводит в очень короткие сроки к полной адгезии всего ресничного аппарата, потере способности к движению и в конечном итоге к концентрации всех корацидиев в центральной придонной части лунки. Концентрация корацидиев, в свою очередь, создает реальные предпосылки для реализации второй фазы РПАК — склеивания корацидиев между собой. Механизмы адгезии на этой фазе, по нашим материалам, не могут быть представлены однозначно. При этом возможно и непосредственное склеивание корацидиев за счет адгезивных свойств специфических комплексов Аг—Ат в местах механического соприкосновения соседних корацидиев; возможно участие в цепи адгезии неспецифических белков антисыворотки, вторично связанных со специфическими комплексами; не исключается также и возможность агглютинирующего действия физических сил. Возможны и комбинации указанных механизмов; их выявление является задачей наших последующих исследований. Вне зависимости от состава механизмов, обусловливающих РПАК на обеих ее фазах, очевидно, что во всех вариантах проведенных нами опытов агглютинация корацидиев обусловливалась одними и теми же иммунохимическими процессами. Вместе с тем результаты РПАК в разных вариантах опытов имели постоянные и достаточно наглядные различия, которые, с одной стороны, позволили построить шкалу оценки качественных особенностей РПАК (см. таблицу) и, с другой стороны, дают возможность дифференцированной оценки специфики РПАК в отдельных вариантах опытов. По условиям эксперимента в разных вариантах опытов различались параметры только одного фактора — степени специфичности (гомологичности) антисыворотки. Тем самым причины качественных различий результатов РПАК в разных вариантах опытов могут быть связаны только со спецификой действия использованных вариантов антисывороток на ПАг каждого из двух исследованных видов корацидиев, т. е. по существу с концентрацией антител, специфичных к ПАГ обоих видов цестод. Как известно, от концентрации специфичных антител в Ас прямо зависит интенсивность агглютинирующих процессов (Зильбер, 1957, и др.), а тем самым темпы адгезии ресничного аппарата и, следовательно, степень синхронности полного (или частичного) обездвиживания корацидиев в каждом варианте опытов. От степени синхронности обездвиживания кораци-



Результаты РПАК корацидиев *D. dendriticum* и *D. ditremum* в поливалентной и монозональной антисыворотках к *D. dendriticum*.

1 — контроль (НКС), *2* — РПАК *D. dendriticum* в поливалентной антисыворотке, *3* — РПАК *D. ditremum* в поливалентной антисыворотке, *4* — РПАК *D. dentriticum* в монозональной антисыворотке.

диев, в свою очередь, зависит характер агломерации — от образования классической «пуговки» при интенсивной и, следовательно, синхронной РПАК до случайного склеивания в небольшие конгломераты (по 2—3 экз.) корацидиев, частично потерявших подвижность (неполная адгезия ресничного аппарата) и неспособных преодолеть агглютинирующие силы за счет собственной активности в случае соприкосновения этих корацидиев в толще испытуемой Ac. Существенно, что, несмотря на наличие широкого диапазона изменений характера агломерации (при суммарном рассмотрении всех вариантов опытов), реализация РПАК в последовательном ряду вариантов имеет дискретную, прерывистую форму. При этом «картина» агглютинации каждого варианта специфична и константна во всех повторностях, а различия даже между наиболее «близкими» вариантами достаточно определенны и легко констатируются визуально (см. рисунок, *1—4*). Наибольшее значение при этом имеет то обстоятельство, что по качественным особенностям РПАК корацидии двух исследованных видов легко дифференцируются (см. таблицу). Эти данные имеют особый интерес, учитывая, что сопоставляемые виды максимально «неудобны» для выявления дифференциальных, видовых отличий. Напомним, что длительное время большинство исследователей рода *Diphyllobothrium* рассматривали *D. ditremum* в качестве синонима *D. dendriticum*. Его видовая самостоятельность была определенно обоснована только в 70-е годы (Bylund, 1975; Фрезе, 1977). Несмотря на установление валидности *D. ditremum*, дифференциация его от близкого *D. dendriticum* по всей совокупности используемых признаков и до сих пор является сложной, а в ряде случаев и неразрешимой задачей (например, на стадиях корацидия, процеркоида, в случаях аберрантных стробил и т. п.). Кроме того, оба сопоставляемых вида чрезвычайно близки по антигенному составу (Frese e. a., 1983).

Все это, казалось бы, оставляет мало шансов на дифференциацию этих видов в иммунологических реакциях. И, тем ни менее, как это видно из таблицы и рисунка *1—4*, видовое определение корацидиев *D. dendriticum* и их дифференциация от таковых близкого вида *D. ditremum* легко осуществляются с помощью обоих использованных вариантов Ac.

Нетрудно видеть, что адсорбированная (видоспецифическая) Ac дает вполне определенные преимущества для дифференциации гомологичных корацидиев: различие гомологичной и гетерологичной РПАК в этом случае максимально и тем самым наиболее наглядно и исключает возможности ошибки в дифференциации (сравни IV и V серии опытов). Максимальное различие картин РПАК в этом случае вполне закономерно: во-первых, за счет адсорбции неспецифических Ат увеличивается относительная концентрация специфичных иммуноглобулинов (степень гомологичности Ac) к виду *D. dendriticum*, результатом чего и является повышение интенсивности (тем самым и синхронности) РПАК и образование классической «пуговки» гомологичных корацидиев в этом варианте (IV серия опытов). И, во-вторых, изъятие в ходе адсорбции Ac на Аг *D. ditremum* всех Ат, выработанных в ответ на родово-, семейственно- и т. д. специфичные Аг (Кравцов, Петрова, 1977), сводит до минимума неспецифичную адгезию ресничного аппарата корацидиев *D. ditremum* в этом варианте (V серия опытов), в результате чего агглютинация этих корацидиев практически отсутствует и картина РПАК мало отличается от таковой в контроле (в случае НКС). Отсутствие поступательного движения корацидиев в этой серии опытов, равно как и отдельные случаи попарного склеивания корацидиев, по всей вероятности, объясняются недостаточной экспозицией Ac на Аг *D. ditremum* при использованной нами схеме адсорбции и тем самым недостаточностью очистки (истощения) Ac. Напротив, при использовании поливалентной (неистощенной) Ac различие картин РПАК в гомологичном и гетерологичном вариантах невелико (сравни II и III серии опытов).

Как видно из данных таблицы и соответствующих рисунка (*1—4*), идентификация *D. dendriticum* и дифференциация его от близкого *D. ditremum* в этом варианте Ac возможна, если ориентироваться на всю совокупность опытов каждой из серий (или на «типичную» для каждой серии картину РПАК). Однако сопоставление II и III серий опытов, как правило, показывало наличие практически идентичных картин РПАК в некотором, хотя и очень небольшом, числе лунок из разных серий. Тем самым по картинам РПАК в поливалентной Ас между II и III сериями опытов нет четкого хиатуса, как это имело место в адсорбированной Ас. При этом в случае гомологичной реакции не наблюдается единого конгломерата корацидиев («пуговки»), что объясняется снижением активности (и синхронности) РПАК в условиях более низкой относительной концентрации видоспецифических Ат к *D. dendriticum*, в свою очередь определяемой наличием в Ас неспецифических Ат, выработанных на родово-, семейственно- и т. д. — специфические Аг.

В случае гетерологичной реакции эти же фракции Ат определяют увеличение степени агглютинации (сравнительно с гетерологичным вариантом на истощенной Ас), что определенным образом указывает на адгезивные свойства родово- и семейственно-специфических Ат.

Изложенные выше особенности РПАК определяют возможность использования этой реакции в работах по систематике групп цестод, в онтогенезе которых имеется стадия корацидия. При этом существенно, что РПАК позволяет получить информацию не только о сходстве и различии самих корацидиев, с которыми ведется непосредственная работа. Нетрудно видеть, что применение РПАК дает возможность идентификации цестод на всех стадиях их онтогенеза. Так, если культуру корацидиев выращивают из яиц, полученных от конкретной стробилы, постановка РПАК определяет принадлежность (или степень сродства) данной стробилы к виду, на Аг которого наработаны диагностикумы (Ас). Тем самым РПАК позволяет решать достаточно частую в практике систематиков задачу: уточнение видовой принадлежности аберрантных стробил, т. е. форм цестод, по тем или иным признакам не соответствующих типовому описанию имагинальной формы данного вида (например, в случаях географического или гостального викарирования и т. п.).

В свою очередь, за счет использования яиц от стробил, видовая принадлежность которых подтверждена с применением РПАК, увеличивается достоверность данных, получаемых при экспериментально-систематическом изучении видовых особенностей цестод на фазе процеркоида (например, данных о границах вариабельности морфологических признаков и т. д.).

И, наконец, при необходимости уточнения видовой принадлежности отдельных форм плероцеркоидов, «привязка» которых к какому-либо из видов цестод, описанных по имагинальной стадии, вызывает затруднения, получение из них стробил с последующей постановкой РПАК дает дополнительный критерий для оценки видового статуса плероцеркоидов.

Круг вопросов, где применение РПАК как дополнительного критерия способно повысить обоснованность анализа, естественно не ограничивается перечисленным выше. Очевидно, что во всех случаях, когда используемые в настоящее время критерии не обеспечивают надежности заключения о валидности или границах видов цестод, результаты РПАК могут дать дополнительные аргументы. При этом следует отметить, что данный критерий имеет заметные преимущества сравнительно со многими, широко используемыми в цестодологических работах.

Как можно видеть при сравнении IV и V серий опытов, результаты РПАК даже у крайне близких видов резко контрастны (альтернативны), что сводит до минимума возможность ошибки при оценке самостоятельности этих видов.

Выше уже указывалось, что по результатам РПАК возможна идентификация диагносцируемого вида на всех стадиях его развития. Как известно, по большинству из применяемых сейчас критериев описания даются отдельно для каждый фазы жизненного цикла. При этом принадлежность различных стадий развития (процеркоидов, плероцеркоидов) к тому же самому или разным видам зачастую остается неясной и вызывает длительные дискуссии.

И, наконец, при проведении РПАК в поливалентной Ас к Аг определенного вида цестод возможно получение информации о степени сродства (близости) к данному виду тех или иных сопоставляемых форм (при сравнении степени агломерации; например, по предлагаемой в данной статье шкале). Как известно, такая задача при использовании обычных для систематики цестод критериев практически невыполнима.

Литература

Гостев В. С. Химия специфического иммунитета. М., Медгиз, 1959. 269 с.

Зильбер А. А. Основы иммунологии. М., Медгиз, 1957. 437 с.

Кравцов Е. Г., Петрова В. М. Иммунологическое определение дифиллоботриид Карелии и Западной Сибири. — Вопросы краевой инфекционной патологии. Л., 1977, с. 121—122.

Фишер М. П., Кобец О. Е., Кудряков В. Т. Анализ специфичности серодиагностических реакций агглютинации методом треугольной диаграммы Розенбома. — Архив биол. наук, сер. Б, 1934, т. 35, с. 661—674.

Фрезе В. И. Лентецы Европы (экспериментальное изучение полиморфизма). — В кн.: Цестоды и трематоды. М., Наука, 1977 (Тр. ГЕЛАН, т. 27), с. 174—204.

Bylund G. Delimitation and characterization of European Diphyllobothrium species. — Acad. Dissert. Dep. Biol. Abo Acad., 1975, 143 p.

Freze V. I., Sergeeva E. G., Kulinich L. I. Antigenic affinity of cestode species from the genus Diphyllobothrium (Cestoidea: Diphyllobothriidae) recorded from the territory of Karelia. — Helminthologia, 1983, vol. 20, N 2, p. 121—129.

Hilliard D. K. Studies on the helminth fauna of Alaska. 38. Taxonomic significance of eggs and coracidia of some diphyllobothriid cestodes. — J. Parasitol., 1960, vol. 46, p. 701—716.

Lefkovits I., Pernis B. (ed.). Immunological methods. II. Acad. Press., 1981. 348 p.

ГЕЛАН СССР, Москва

Поступило 27 VII 1984

REACTION OF AGGLUTINATION OF PSEUDOPHYLLID CESTODES CORACIDIA AND ITS USAGE IN CESTODOLOGICAL STUDIES

V. I. Freze, M. V. Dalin, E. G. Sergeeva

SUMMARY

Ability of coracidia to agglutination in homologous antiserum was established. The method of reaction of a direct agglutination of coracidia (RDAC) in the culture of alive larvae was described. When comparing the RDAC results in homologous and heterologous variants a dependence of the agglutination pattern on the degree of antiserum homology was established. On the example of RDAC of the cestodes *Diphyllobothrium dendriticum* and *D. ditremum* in polyvalent and species-specific antisera to *D. dendriticum* possibility was shown of RDAC usage in the studies on specific taxonomy of pseudophyllid cestodes.